



УДК 577.123

2',3'-ДИДЕЗОКСИ-3'-АМИНОНУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТЫ ИНГИБИРУЮТ РЕПАРАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ДНК В ХРОМАТИНЕ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС

А. А. Краевский, М. К. Куханова, Л. А. Александрова,
Н. В. Белякова, В. М. Крутяков

Введение. Соединения daNTP проявляют свойства эффективных ингибиторов синтеза ДНК *in vitro*, катализируемого ДНК-полимеразой I из *E. coli* и ДНК-полимеразами эукариот (α — из тимуса теленка и β — из печени крыс) [1]. Механизм ингибирования ферментативного синтеза ДНК при действии daNTP состоит в конкуренции daNTP с природными субстратами dNTP (в соответствии с природой основания) за включение в растущую цепь ДНК. После включения остатков 2', 3'-дидезокси-3'-амино-5'-монофосфатов в 3'-конец растущей цепи присоединение следующих звеньев по аминокгруппе 3'-концевого нуклеотидного остатка не осуществляется. Таким образом, daNTP оказались эффективными терминаторами синтеза ДНК, катализируемого репликативной ДНК-полимеразой α и репаративной ДНК-полимеразой β млекопитающих [1]. Ранее терминирующие свойства при катализе синтеза ДНК ДНК-полимеразой I из *E. coli* были показаны для ddNTP [2]. Именно это свойство терминировать синтез цепей ДНК позволило использовать ddNTP [3, 4] и daNTP [1] для установления последовательности нуклеотидов в ДНК полимеризационным методом.

Нами показано также, что 2', 3'-дидезокси-3'-аминонуклеозиды ингибируют репликативный синтез ДНК в эмбрионах морских ежей, хотя молекулярный механизм этого ингибирования еще не изучен [5]. В то же время в опытах на ядрах эмбрионов морских ежей обнаружено [6], что daNTP ингибируют синтез фрагментов Оказаки столь же эффективно, как и агаТТР — известный ингибитор репликативного синтеза ДНК *in vitro* с ферментами из млекопитающих [7].

В этой статье сообщается, что daNTP ингибируют синтез ДНК в γ -облученном хроматине из покоящихся клеток печени (G_0) крыс *in vitro*. Хроматин неделящихся клеток выбран нами в первую очередь как объект, в котором синтез ДНК катализируется ДНК-полимеразой β , так как ДНК-полимераза α отмывается при выделении ядер и хроматина [8, 9]. Как упоминалось выше, для очищенной ДНК-полимеразы β уже проведено исследование с daNTP [1]. Кроме того, γ -облучение вызывает в ДНК образование брешей очень малых размеров [10—12], которые не могут репарироваться ДНК-полимеразой α и таким образом дополнительно гарантируется участие исключительно ДНК-полимеразы β . Измеряемый в настоящей работе синтез является репаративным,

Принятые сокращения: dNTP — 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты с основаниями аденин (dATP), цитозин (dCTP), гуанин (dGTP) и тимин (dTTP); daNTP — 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозид-5'-трифосфаты с основаниями соответственно аденин (daATP), цитозин (daCTP), гуанин (daGTP) и тимин (daTTP); d(az)TTP — 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидин-5'-трифосфат; ddTTP — 2',3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфаты с основаниями аденин (ddATP), цитозин (ddCTP), гуанин (ddGTP) и тимин (ddTTP); агаТТР — 1-(β -D-арабинофуранозил)-тимин-5'-трифосфат.

поскольку регистрируется вызванное повреждением предсуществующей ДНК ковалентное матричное присоединение 2'-дезоксинуклеозид-5'-монофосфатных остатков из dNTP к 3'-концам разрывов. [9]. Такое репаративное заполнение разрывов и брешей ведет далее к лигированию фрагментов поврежденной хроматиновой ДНК.

В результате проведенного исследования показано, что при репарации γ -облученного хроматина daNTP оказались высокоэффективными ингибиторами. Их можно сравнить с ddNTP, которые наиболее сильно блокируют катализируемый ДНК-полимеразой β синтез ДНК.

Материалы и методы. Хроматин выделяли из печени крыс, как это описано ранее [13], с единственной модификацией, заключающейся в замене 1 %-ного тритона на 2 %-ный. Состав полученного таким образом хроматина следующий: ДНК : РНК : гистоны : негистоновые белки (1 : 0,05 : 1 : 1). В хроматине содержатся все пять гистонов и сохраняется нуклеосомная структура [13].

Облучение хроматина проводили на облучателе РХ- γ -30 (СССР) с ^{60}Co -облучателем, время 30 мин, доза 100 крад; ddTTP фирмы «PL» (США), daNTP синтезированы Зайцевой и др. [14], araTTP — по [15]. [^3H]dNTP фирмы «Изотоп» (СССР), удельная радиоактивность для [^3H]dTTP 15,6 Ки/ммоль, [^3H]dATP — 23,4 Ки/ммоль, [^3H]dGTP — 19,3 Ки/ммоль и [^3H]dCTP — 16,8 Ки/ммоль.

Использовали две системы: «а» — так называемая односубстратная система и «б» — четырехсубстратная система. Система «а» содержала буферный раствор (50 мМ трис-НСl, рН 8,3, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ АТФ и 2 мкКи [^3H]dNTP). Система «б» дополнительно ко всем компонентам односубстратной системы содержала три немеченные dNTP в концентрации 10 мкМ. Порядок внесения компонентов был следующим: хроматин, АТФ+один [^3H]dNTP (плюс три дополнительные dNTP в случае четырехсубстратной системы), ингибиторы и затем соли. Время инкубации 30 мин, температура 37 °С [13]. Концентрации ингибиторов указаны в подписях к таблицам и рисункам.

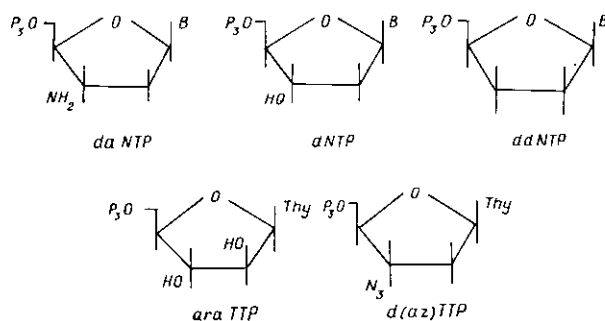
Результаты и обсуждение. Изучение действия ингибиторов на репарацию ДНК проводилось нами в нескольких системах:

в четырехсубстратной системе с одним радиоактивным субстратом и отличающимся от него по природе основания ингибитором;

в односубстратной системе с одним радиоактивным субстратом и тремя отличающимися от него по природе основания ингибиторами;

в четырехсубстратной системе с одним радиоактивным субстратом и одинаковым с ним по природе основания ингибитором.

Изучаемые в настоящей работе ингибиторы daNTP отличаются от природных субстратов dNTP замещением гидроксила при С_{3'} в dNTP на амногруппу. В ddNTP в 3'-положении находится протон.



где P₃ — трифосфатный остаток; В — Ade, Thy, Gua, Cyt.

Так называемая четырехсубстратная система включает в себя один радиоактивный субстрат, количество которого в пробе составляет 2 мкКи, а концентрация около 0,7 мкМ; остальные три субстрата содержатся в инкубационной среде в концентрации 10 мкМ. Действие ингибиторов мы изучали в вариантах, когда ингибитор и радиоактивно

меченный субстрат различались по природе основания в них или же были одинаковы.

Четырехсубстратная система с радиоактивным субстратом и отличающимся от него по природе основания ингибитором. В этой системе было проведено несколько серий экспериментов. В одной из серий облученный хроматин репарировался в присутствии [³H] dTTP и dATP, dGTP и dCTP с добавлением daCTP в концентрациях 10 мкМ (т. е. в молярном соотношении daCTP : dCTP 1:1) и 180 мкМ (daCTP : dCTP 18:1). Как видно из табл. 1 (опыт 1), никакого ингибирования синтеза ДНК отмечено не было. Подобные результаты были получены и для серии с [³H]dCTP+dTTP+dATP+dGTP с ингибитором daTTP — при молярном соотношении daTTP : dTTP 18:1 никакого ингибирования также не было отмечено (опыт 2). В качестве контроля использовали ddTTP (соотношение ddTTP : dTTP 100 : 1) и agaTTP (такое же соотношение). Эти соединения также не ингибировали синтез ДНК (опыт 3).

Таблица 1

Репаративный синтез ДНК в присутствии ингибиторов в системе с четырьмя субстратами
Repair DNA synthesis in the Presence of Inhibitors in the System with Four Substrates

| № опыта | [³ H]dNTP | Ингибитор и его концентрация | Включение радиоактивной метки в ДНК. | |
|-----------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----|
| | | | имп/мин | % |
| Облученный хроматин | | | | |
| 1 | dTTP | — | 10600 | 100 |
| | dTTP | daCTP, 10 мкМ | 11450 | 108 |
| 2 | dTTP | daCTP, 180 мкМ | 11015 | 104 |
| | dCTP | — | 13200 | 100 |
| 3 | dCTP | daTTP, 180 мкМ | 14220 | 108 |
| | dGTP | — | 6870 | 100 |
| | dGTP | ddTTP, 1 мМ | 6340 | 92 |
| | dGTP | agaTTP, 1 мМ | 8360 | 120 |
| Необлученный хроматин | | | | |
| 4 | dTTP | — | 6890 | 100 |
| | dTTP | daCTP, 1 мМ | 5850 | 85 |
| | dTTP | daGTP, 1 мМ | 6290 | 91 |
| | dTTP | daATP, 1 мМ | 7800 | 113 |

Дополнительным контролем явились опыты с необлученным хроматином, репаративный синтез в котором вызывался исключительно за счет нуклеазной деградации ДНК в процессе выделения хроматина [13]. Как видно из результатов опыта 4 (табл. 1), при молярном соотношении daNTP : dNTP 100:1 практически никакого ингибирования не отмечено для всех трех ингибиторов daATP, daCTP и daGTP.

Односубстратная система с [³H] dTTP и [daCTP+dATP+dGTP]. Опыты по изучению влияния daNTP с основаниями различной природы по сравнению с меченым субстратом были проведены также в односубстратной системе. В этом варианте к репарирующему хроматину прибавляли только один радиоактивный субстрат до концентрации около 0,7 мкМ. Репаративный синтез происходит либо только с одним субстратом, либо в нем принимают участие эндогенные субстраты, незначительное количество которых может быть адсорбировано на хроматине. Чтобы усилить эффект daNTP, в каждый опыт вносили по три daNTP, дополнительных по отношению к меченому субстрату, и наблюдали их действие на включение метки. Даже при высоких концентрациях daNTP никакого ингибирования репара-

ции облученного хроматина замечено не было (табл. 2). Ингибированные репарации необлученного хроматина также было весьма незначительным.

Четырехсубстратная система с одним радиоактивным субстратом и одинаковым с ним по природе основания ингибитором. Эту серию опытов проводили подобно описанной выше с внесением в инкубационную среду радиоактивно меченного субстрата до концентрации 0,7 мкМ, трех немеченых субстратов в концентрации 10 мкМ и одноименного с меченым субстратом daNTP в различных концентрациях. Проведены две серии опытов. В одной из них в среду с облученным хроматином и со всеми компонентами синтеза вносили ингибиторы с различной химической природой сахара, но с тиминном в качестве основания.

Таблица 2

Репаративный синтез ДНК в присутствии ингибиторов в системе с одним субстратом [³H]dTTP
Repair DNA Synthesis in the Presence of Inhibitors in the System with One Substrate, [³H]dTTP

| № опыта | Концентрация daCTP + daGTP + daATP, мкМ каждого | Включение радиоактивной метки в ДНК. | |
|-----------------------|---|--------------------------------------|-----|
| | | имп/мин | % |
| Облученный хроматин | | | |
| 1 | — | 6280 | 100 |
| | 2,5 | 6540 | 104 |
| | 200 | 6410 | 102 |
| Необлученный хроматин | | | |
| 2 | — | 2570 | 100 |
| | 2,5 | 2390 | 92 |
| | 200 | 2140 | 83 |

Таблица 3

Ингибирование репаративного синтеза ДНК в системе с четырьмя субстратами и ингибитором, основание в котором аналогично основанию меченого субстрата
Inhibition of Repair DNA Synthesis in the System Containing Four Substrates and Inhibitor with the Base Similar to that Labelled Substrate

| [³ H]dNTP | Ингибитор | Концентрация ингибитора, М | Молярное соотношение ингибитор: субстрат |
|-----------------------|-----------|----------------------------|--|
| dTTP | daTTP | 0,65 | 1:1 |
| dATP | daATP | 0,65 | 1:1 |
| dCTP | daCTP | 0,65 | 1:1 |
| dGTP | daGTP | 1,5 | 2:1 |
| dTTP | ddTTP | 0,65 | 1:1 |
| dTTP | d(az)TTP | — | — |
| dTTP | araTTP | 2,4 | 4:1 |

Как видно из рис. 1, daTTP и ddTTP полно и эффективно ингибировали репаративный синтез ДНК, причем их активность была практически одинаковой. Ингибирование araTTP было значительно более слабым и достигало максимално 70 %. В то же время d(az)TTP никак не влиял на репаративный синтез ДНК.

На рис. 2 приведено сравнение ингибирующих эффектов четырех daNTP. Эффективность daTTP, daCTP и daATP примерно одинакова, однако подавление синтеза пиримидиновыми производными было полным, а в случае daATP достигло 70 % и далее не изменялось даже при соотношении ингибитор: субстрат 350:1 (данные не приводятся); daGTP ингибировал синтез несколько слабее, возможно, из-за адсорбции на хроматине эндогенного dGTP.

Табл. 3 иллюстрирует данные по концентрациям ингибиторов, на 50 % подавляющим репаративный синтез. Соединения daTTP, daCTP, daATP и ddTTP на 50 % ингибируют синтез уже при концентрации, равной концентрации меченого субстрата, тогда как daGTP и araTTP подавляют синтез несколько слабее.

В результате проведенных экспериментов можно сделать следующие выводы. Все четыре daNTP являются мощными ингибиторами репаративного синтеза ДНК в полной системе. По эффективности daTTP был аналогичен ddTTP, тогда как araTTP был значительно более слабым ингибитором. Ингибирование синтеза ДНК всеми тремя типами ингибиторов (daNTP, ddTTP и araTTP) имело место лишь в случае, если основания в ингибиторе и меченом субстрате были одинаковыми.

Из анализа этих результатов можно видеть, что репаративный синтез ДНК в системе облученного хроматина действительно катализируется ДНК-полимеразой β . В пользу этого свидетельствует значительно более сильное ингибирование системы с помощью ddTTP по сравнению с araTTP, как это характерно для синтеза, катализируемого ДНК-полимеразой β [7, 16, 17]. Более того, наши данные косвенно подтверждают, что бреши, возникающие при γ -облучении ДНК, дейст-

Рис. 1. Ингибирование репаративного синтеза ДНК в γ -облученном хроматине из печени крыс в системе с 0,7 мкМ $[^3\text{H}]d\text{TTP}$ и 10 мкМ dATP: dCTP и dGTP при различных концентрациях daTTP (1); ddTTP (2); araTTP (3) и d(az)TTP (4). 100 %-ной активности соответствует включение 8000—12000 имп/мин в пробе.

Fig. 1. Inhibition of the repair DNA synthesis in γ -irradiated rat liver chromatin in the system with 0.7 μM $[^3\text{H}]d\text{TTP}$ and 10 μM dATP: dCTP and dGTP with different concentrations of daTTP (1); ddTTP (2); araTTP (3) and d(az)TTP (4). Incorporation of $(8-12) \cdot 10^3$ cpm in one test corresponds to 100 % activity.

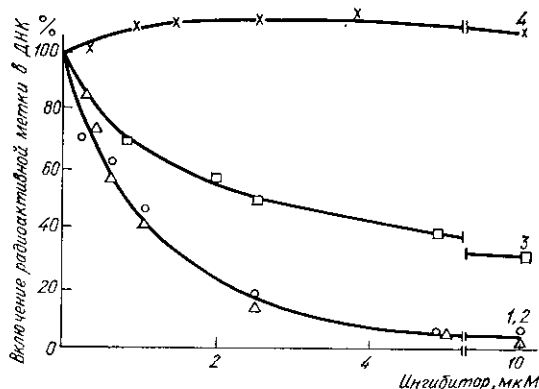
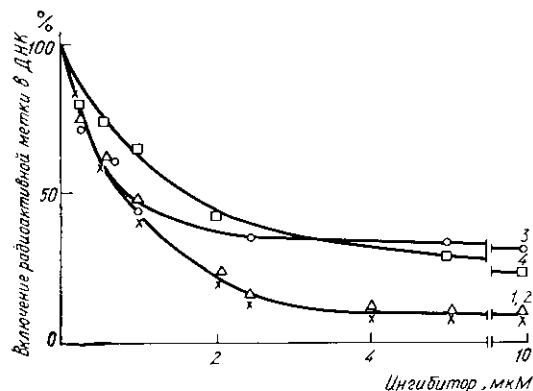


Рис. 2. Ингибирование синтеза в четырехсубстратной системе с γ -облученным хроматином в вариантах: $[^3\text{H}]d\text{TTP} + da\text{TTP}$ (1); $[^3\text{H}]d\text{CTP} + da\text{CTP}$ (2); $[^3\text{H}]d\text{ATP} + da\text{ATP}$ (3) и $[^3\text{H}]d\text{GTP} + da\text{GTP}$ (4). 100 %-ной активности соответствует включение 8000—12000 имп/мин в пробе.

Fig. 2. Inhibition of repair DNA synthesis in the system with four substrates and γ -irradiated chromatin: $[^3\text{H}]d\text{TTP} + da\text{TTP}$ (1); $[^3\text{H}]d\text{CTP} + da\text{CTP}$ (2); $[^3\text{H}]d\text{ATP} + da\text{ATP}$ (3); $[^3\text{H}]d\text{GTP} + da\text{GTP}$ (4). Incorporation of $(8-12) \cdot 10^3$ cpm in one test corresponds to 100 % activity.



вительно очень малы, что было показано несколькими методами [10—12]. Например, в работе [13] обнаружено, что до 40 % разрывов γ -облученной ДНК в хроматине лигируется без дополнительного репаративного синтеза; такое лигирование может происходить лишь в случае разрывов фосфодиэфирной связи [18].

В нашем случае ингибирование синтеза ДНК блокаторами с основаниями, идентичными основаниям субстратов, объясняется прямой конкуренцией между ними, например конкуренцией daTTP (а также ddTTP или araTTP) с $[^3\text{H}]d\text{TTP}$. Конкуренция между ингибиторами и субстратами с различающимися основаниями возможна только в случае более удлиненных брешей. Полученные результаты показывают, что γ -облучение хроматина вызывает образование большого количества брешей с выщеплением лишь одного нуклеотидного остатка.

Примерно одинаковый эффект всех четырех daNTP, а также ddTTP вполне соответствует данным, полученным в опытах с очищенной ДНК-полимеразой β из печени крыс *in vitro* [1]. В этих опытах также показано, что 50 %-ное ингибирование синтеза ДНК достигается при соотношении dNTP:daNTP 1:1 (в молях). Данные работы [1] свидетельствуют, что daNTP, как и ddNTP, служат терминаторами синтеза ДНК. Относительно ddTTP в системе с целыми клетками миеломы

мышь было обнаружено, что этот ингибитор также терминирует синтез ДНК. Принимая во внимание все названные факты, можно полагать, что даNTP служат терминаторами и в системе репарирующего хроматина, хотя строгих доказательств этому мы не имеем.

Авторы благодарны А. В. Иткесу за критический разбор работы.

2',3'-DIDEOXY-3'-AMINONUCLEOSIDE-5'-TRIPHOSPHATES INHIBIT REPAIR DNA SYNTHESIS IN RAT LIVER CHROMATIN

A. A. Kravosky, M. K. Kukhanova, L. A. Alexandrova,
N. V. Belyakova, V. M. Krutyakov

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow
B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics, Academy of Sciences of the USSR, Gatchina, Leningrad

Summary

2',3'-dideoxy-3'-aminonucleoside-5'-triphosphates are shown to be strong inhibitors of repair DNA synthesis in γ -irradiated rat liver chromatin. The activity of these compounds is comparable with that of the most effective inhibitors of the DNA-polymerase β -catalyzed repair DNA synthesis

1. 2',3'-Dideoxy-3'-aminonucleoside-5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases / Z. G. Chidgeavadze, R. Sh. Beabealashvili, A. M. Atrazhev et al.— Nucl. Acids Res., 1984, 12, N 3, p. 1671—1686.
2. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXIV. Termination of chain growth by 2',3'-dideoxyribonucleotide / M. R. Atkinson, M. P. Deutscher, A. Kornberg et al.— Biochemistry, 1969, 8, N 12, p. 4897—4904.
3. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, 74, N 12, p. 5463—5467.
4. Smith A. S. H. DNA sequence analysis by primed synthesis.— Meth. Enzymol., 1980, 65, p. 560—580.
5. Ингибирование биосинтеза ДНК в эмбрионах морских ежей с помощью 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозидов / М. К. Куханова, С. В. Кочеткова, А. А. Краевский и др.— Биохимия, 1983, 48, № 10, с. 1747—1751.
6. Ингибирование репликативного синтеза ДНК в ядрах эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedium* 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозид-5'-трифосфатами / М. К. Куханова, А. А. Краевский, Н. А. Терентьева, В. А. Рассказов.— Биополимеры и клетка, 1985, 1, № 2, с. 79—86.
7. Cozzarelli N. R. The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis.— Ann. Rev. Biochem., 1977, 46, p. 641—648.
8. Lynch W. E., Surrey S., Lieberman J. Nuclear deoxyribonucleic acid polymerases of liver.— J. Biol. Chem., 1975, 250, N 20, p. 8179—8183.
9. Белякова Н. В., Нарыжный С. Н., Крутяков В. М. Механизмы активирующего действия АТФ на репаративный синтез ДНК в хроматине.— Молекуляр. биология, 1980, 14, № 4, с. 586—594.
10. Miller M. R., Lui L. H. Participation of different DNA polymerases in mammalian DNA repair synthesis is not related to «Patch size».— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, 108, N 4, p. 1676—1682.
11. Cleavage of pyrimidine dimers in specific DNA sequences by a pyrimidine dimer DNA glycosylase of *M. Luteus* / W. A. Haseltine, L. K. Gordon, C. P. Lindan et al.— Nature, 1980, 285, N 5767, p. 634—640.
12. Rainter P. B. Repair in mammalian cells: overview.— In: Mol. Mech. Repair DNA / Ed. A. Kornberg. N. Y.; London: Acad. Press, 1975, part B, p. 595—600.
13. Крутяков В. М., Кравецкая Т. П. Эндогенный синтез ДНК в выделенном хроматине.— Молекуляр. биология, 1978, 12, № 3, с. 654—662.
14. Аминонуклеозиды и их производные. XI. Синтез 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозид-5'-трифосфатов / В. Е. Зайцева, Н. Б. Дяткина, А. А. Краевский и др.— Биоорганическая химия, 1984, 10, № 5, с. 670—680.
15. Schinazi R. F., Chen M. S., Prusoff W. H. Antiviral and antineoplastic activities of pyrimidine arabinosyl nucleosides and their 5'-amino derivatives.— J. Med. Chem., 1979, 22, N 10, p. 1273—1277.
16. Ono K., Ogasawara M., Matsukage A. Inhibition of the activity of DNA polymerase α by 2',3'-dideoxythymidine-5'-triphosphate.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, 88, N 4, p. 1255—1262.
17. Edenberg H. J., Anderson S., De Pamphilis M. L. Involvement of DNA polymerase α in simian virus 40 DNA replication.— J. Biol. Chem., 1978, 253, N 9, p. 3273—3280.

18. Byars N., Kidson C. DNA chain termination by 2',3'-dideoxythymidine in replicating mammalian cells.— *Biochemistry*, 1975, 14, № 14, p. 3159—3164.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва
Ленинград. ин-т ядерной физики им. Б. П. Константинова
АН СССР, Гатчина

Получено 16.07.84

УДК 577.123

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ 3'-ДЕЗОКСИ-3'-АМИНОТИМИДИНА В КЛЕТКАХ МИЕЛОМЫ МЫШИ $p_38Ag653$ В КУЛЬТУРЕ И ВКЛЮЧЕНИЕ ЕГО В ДНК

С. В. Кочеткова, М. К. Куханова, А. А. Краевский

Введение. 2',3'-Дидезокси-3'-аминонуклеозиды, в отличие от своих рибоаналогов, изучены в клеточных системах очень мало [1]. Показано, что даТ эффективно ингибировал рост ряда клеток млекопитающих в культуре, а именно: саркомы мышей 180 и лейкемии мышей L1210, а также клеток, зараженных вирусом герпеса 1 [2]. Высокой цитотоксичностью по отношению к ряду культур клеток (мышь L1210, человека D-98) обладали даС и даТ [3, 4]. Включение [3H] тимидина в ДНК в клетках мыши L1210 ингибировал даС [4], в растущих эмбрионах морских ежей — даТ и даА [5]. Все эти данные косвенно показывают, что даN ингибируют биосинтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразами, однако строгих доказательств получено не было.

В то же время даNTP в системах *in vitro* эффективно ингибировали синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразами I из *E. coli* (α — из тимуса теленка и β — из печени крыс) [6]. Эти соединения реагировали с 3'-концом растущей цепи, причем остаток даNMP включался в цепь, прерывал дальнейшую полимеризацию и выступал таким образом в качестве терминатора.

Кроме того, было найдено, что даNTP являются мощными ингибиторами репликации в ядрах эмбрионов морских ежей *in vitro* [7] и репарации в γ -облученном хроматине из печени крыс *in vitro* [8].

В этой работе показано, что [3H]даТ проникает в клетки миеломы мышей $p_38Ag653$ в культуре, подвергается фосфорилированию, трифосфорилированию и, включаясь в ДНК, терминирует элонгацию цепей.

Материалы и методы. [3H]тимидин фирмы «Изотоп», СССР, удельная радиоактивность 26,8 Ки/ммоль; [3H]даТ был получен из даТ в Ин-те химической физики АН СССР В. А. Шишковым с сотр., удельная радиоактивность 0,071 Ки/ммоль. Свидетели даТ, даTMP и даTTP, а также их флюорескаминные производные получены по [9, 10]. Клетки миеломы мыши $p_38Ag653$ были предоставлены Г. Т. Богачевой, ВКНЦ АМН СССР. Фильтры GF/C и бумага DE-81 фирмы «Whatman», Англия.

Включение [3H]тимидина, или [3H]даТ, в ДНК определяли, согласно [11]. После остановки реакции охлаждением в бане со льдом клетки отмывали изотоническим раствором, лизировали водой, лизат наносили на фильтры GF/C, промывали фильтры холодной 5 %-ной ТХУ с 1 % пиродифосфата натрия, затем этанолом, высушивали и просчитывали радиоактивность в жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-30 («Intertechique», Франция).

Анализ продуктов фосфорилирования [3H]даТ в клетках. Суспензию клеток (500—700 тыс. клеток в 100 мкл) инкубировали с [3H]даТ при 37 °C 2 ч, клетки обрабатывали, как описано выше. 0,05 мл лизата клеток центрифугировали

Сокращения: 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозиды (даN) с основаниями тимин (даТ), цитозин (даС), аденин (даА) и гуанин (даГ); соответственно даNMP, даNDP и даNTP — 5'-моно-, 5'-ди- и 5'-трифосфаты 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозидов с теми же основаниями.